

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. H. Mooser

Untersuchungen über Mutationen von Proteus OX2 und OX19 mit Hilfe von Bacteriophagen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

HANS RUDOLF MARTI
von Othmarsingen (Aargau)

genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. H. Mooser

Zürich 1950
Juris-Verlag, Zürich

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. H. Mooser

**Untersuchungen
über Mutationen von Proteus OX2 und OX19
mit Hilfe von Bacteriophagen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

HANS RUDOLF MARTI

von Othmarsingen (Aargau)

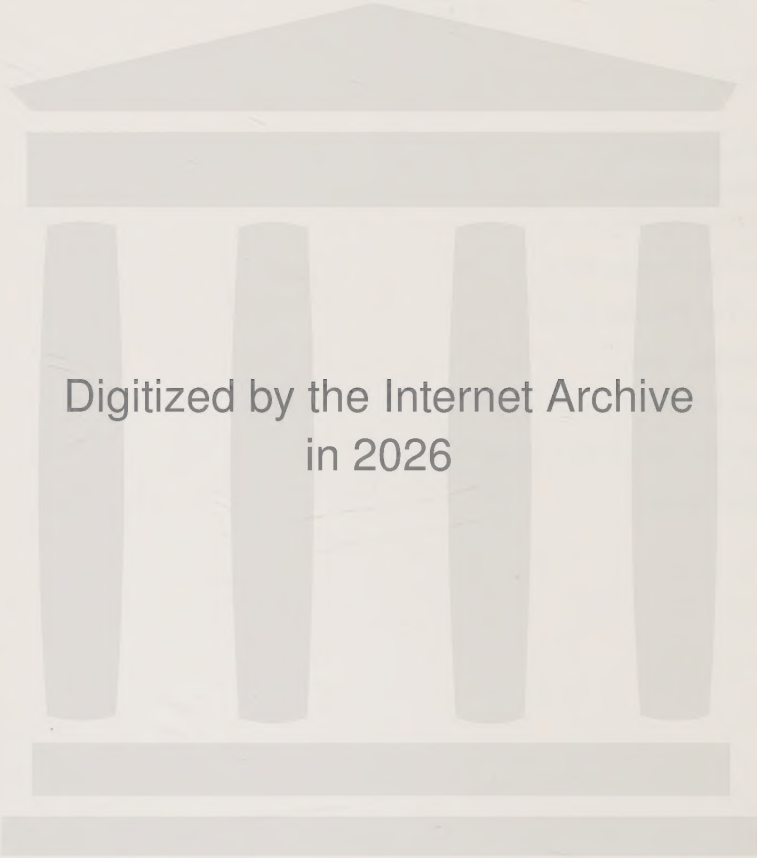
genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. H. Mooser

Zürich 1950
Juris-Verlag, Zürich



I N H A L T

Einleitung	5
Material	7
1. Proteus-Stämme	7
2. Bacteriophag	8
3. Arbeitsmethode	10
Mutanten von Proteus OX2	12
Mutanten von Proteus OX19	20
Weil-Felix-Reaktion	24
Häufigkeit der Mutationen bei Proteus OX2 und OX19	25
Angriffspunkt des Bacteriophagen	26
Zusammenfassung	30



Digitized by the Internet Archive
in 2026

EINLEITUNG

Auf der Suche nach dem Erreger des Typhus exanthematicus isolierten Weil und Felix im Jahre 1916 in Ostgalizien aus dem Urin und aus Blutkulturen von Fleckfieberkranken zahlreiche Proteusstämme, welche von Seren der Fleckfieberpatienten in hoher Verdünnung agglutiniert wurden. Zufolge dieser besonderen Eigenschaft fassten die beiden Autoren die betreffenden Stämme zusammen und nannten sie Proteus X-Stämme. Der von Fleckfieberserum am stärksten agglutinierte Stamm war Proteus X 19.

Obwohl Rocha Lima im selben Jahr die Rickettsie als Erreger des Fleckfiebers beschrieb, erlangte die Agglutination der Proteus X-Stämme als sog. Weil-Felix-Reaktion doch grosse diagnostische Bedeutung, weil damals noch keine Methode bekannt war, aus Rickettsien ein diagnostisches Antigen zu gewinnen.

Da in menschlichen Seren Normalagglutinine gegen das H-Antigen der Proteus-Stämme vorkommen können, muss die Reaktion mit reinen O-Stämmen ausgeführt werden.

Es zeigte sich, dass Patientenseren, die mit Proteus OX 19 eine positive Weil-Felix-Reaktion ergeben, häufig auch den X2-Stamm in hoher Verdünnung agglutinieren, so dass dem Proteus OX 2 ebenfalls eine gewisse Bedeutung für diagnostische Zwecke zukommt. Fletcher und Lessar fanden 1925, dass bei gewissen Krankheitsfällen, die sie damals für Fleckfieber hielten, die Weil-Felix-Reaktion mit Proteus OX 19 negativ ausfiel. Sie beobachteten, dass die Seren der betreffenden Patienten hingegen einen von Dr. Kingsbury erhaltenen Proteus X-Stamm in hoher Verdünnung agglutinierten, und schlossen daraus, dass es sich beim Proteus Kingsbury um einen besondern Stamm handle, den sie Proteus XK benannten. Wie sich später herausstellte, waren die Fälle, die mit Proteus OXK eine positive Weil-Felix-Reaktion ergaben, nicht Fleckfieber, sondern Tsutsugamushi.

Den Ausfall der Weil-Felix-Reaktion bei den wichtigsten Rickettsiosen gibt folgendes Schema wieder:

		Typhus exanthematicus	Rocky Mountain spotted fever	Tsutsugamushi	Q-Fever	Wollhyn. Fieber
Proteus	OX 19	+++	+	—	—	—
»	OX 2	±	+	—	—	—
»	OXX	—	+	+++	—	—

Es gehört nicht in den Rahmen dieser Arbeit, das Wesen der Weil-Felix-Reaktion zu diskutieren und auf die mannigfachen Diskussionen ihrer Interpretation einzutreten.

Wir stellten uns die Aufgabe, aus reinen OX 2- und OX 19-Stämmen Mutanten herauszuzüchten, diese antigenetisch gegeneinander abzugrenzen und ihre Bedeutung für die Weil-Felix-Reaktion zu untersuchen, um dadurch einen Beitrag zu liefern an die heutigen Kenntnisse zweier wichtiger Proteus-Stämme.

Unsere Arbeit ist eine Weiterführung von Untersuchungen, die schon im Jahre 1924 von Dr. Fejgin publiziert wurden. In der Annahme, dass der Proteus X 19 bei der Aetiologie des Fleckfiebers eine Rolle spiele, untersuchte die Autorin damals im Tierversuch die therapeutische Wirkung eines Anti-Proteus-Bacteriophagen. Dabei isolierte sie aus dem Lysat eines X 19 H-Stammes in vitro und in vivo sog. Varianten, die sie teils für Proteus X 19, teils für echte Mutanten hielt, ohne zunächst ihre Beziehung zum originären Stamm genau abzuklären.

Originalarbeiten:

Weil und Felix, Wien. klin. Wschr. (1916) 29, 33, 974.

Rocha-Lima, Berl. klin. Wschr. (1916) 53, 567.

Fetcher und Lessar, Bull. Inst. Med. Res. F. M. S. (1925) No. 2.

Fejgin Bronislawa, C. r. Sec. de Biol. 1924, 90, 1106 und 1200.

Material

1. *Proteus*-Stämme

Als Ausgangsmaterial für die vorliegende Arbeit standen uns zwei im Hygiene-Institut der Universität Zürich vorhandene Stämme von *Proteus* OX2 und *Proteus* OX19 zur Verfügung. Ihre Identität wurde mit Hilfe von zwei analogen, aus der «National Collection of Type Cultures» in London bezogenen Stämmen von *Proteus* OX 2 resp. OX 19 geprüft. Wir gingen dabei folgendermassen vor: Von allen vier Stämmen (*Proteus* OX 2-Zürich, OX 2-London, OX 19-Zürich, OX 19-London) stellten wir eine in 2prozentiger Phenollösung abgetötete und nachher auf 0,5 % Phenol verdünnte Bakterienaufschwemmung her, die eine Dichte von ca. $2,5 \times 10^9$ /ccm aufwies. Damit immunisierten wir vier Kaninchen während 20 Tagen, indem wir ihnen dreimal wöchentlich 1 ccm der entsprechenden Aufschwemmung spritzten, in der ersten Woche subkutan, nachher intravenös. 10 Tage nach der letzten Injektion, d. h. am 30. Tag, entnahmen wir Blut zur Serumgewinnung. Mit Hilfe dieser Immunseren verglichen wir unsere Zürcher mit den Londoner Stämmen. Die dazu angestellten Agglutinationsreihen ergaben folgende Resultate:

Serum anti OX2-Zürich	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
+ Stamm OX2-Zürich	+	+	+	+	+	—	—
+ Stamm OX2-London	+	+	+	+	+	—	—

Serum anti OX2-London	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
+ Stamm OX2-Zürich	+	+	+	+	+	+	—
+ Stamm OX2-London	+	+	+	+	+	+	—

Serum anti OX19-Zürich	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
+ Stamm OX19-Zürich	+	+	+	+	+	+	+	—
+ Stamm OX19-London	+	+	+	+	+	+	+	—

Serum anti OX19-London	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
+ Stamm OX19-Zürich	+	+	+	+	+	+	—
+ Stamm OX19-London	+	+	+	+	+	+	—

Um reine O-Agglutinationen zu erhalten und allfällige Spuren von H-Antigenen zu entfernen, wurden die verwendeten Bakterienaufschwemmungen während 1 Std. auf 100 ° C erhitzt.

Weiterhin absorbierten wir unsere Kanichen-Immunsereen während 24 Std. mit lebenden Bakterien bei + 4 ° C und prüften sie nachher auf restliche Antikörper:

Serum anti OX2-Zürich absorbiert mit OX2-London	1:10	1:20	1:40
+ Stamm OX2-London	—	—	—
+ Stamm OX2-Zürich	—	—	—
Serum anti OX2-London absorbiert mit OX2-Zürich	1:10	1:20	1:40
+ Stamm OX2-Zürich	—	—	—
+ Stamm OX2-London	—	—	—
Serum anti OX19-Zürich absorbiert mit OX19-London	1:10	1:20	1:40
+ Stamm OX19-London	—	—	—
+ Stamm OX19-Zürich	—	—	—
Serum anti OX19-London absorbiert mit OX19-Zürich	1:10	1:20	1:40
+ Stamm OX19-Zürich	—	—	—
+ Stamm OX19-London	—	—	—

Alle Agglutinationen erfolgten bei + 4 ° C. Die Resultate wurden nach 24 Std. abgelesen.

Die einfachen Agglutinationen sowie die Agglutinationen nach kreuzweiser Absorption ergaben somit eine vollkommene serologische Uebereinstimmung der entsprechenden Zürcher und Londoner Stämme.

2. Bacteriophag

Aus einem Phagengemisch französischer Herkunft, das sich als Therapeuticum im Handel befand, wurde 1939 von Herrn Prof. Mooser ein Bacteriophag für *Proteus* OX2 und *Proteus* OX19 isoliert. Beide Phagen wurden uns in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Anti-OX2- und anti-OX19-Phagen wurden stets in getrennten Passagen gezüchtet. Beide Phagenstämme ergaben jedoch bei der Titration mit *Proteus* OX2 und OX19 stets den gleichen

Titer, d. h. jeder Phag lysiert *Proteus* OX2 und OX19 bis zur gleichen Verdünnung. Die Zeit bis zur vollständigen Lyse der Bakterienkulturen wurde in zahlreichen Versuchen gemessen und war *ceteris paribus* für OX2 und OX19 stets gleich. Um allfällige Antigen-Unterschiede der beiden Phagenstämme zu finden, wurde je ein Kaninchen mit anti-OX2- resp. anti-OX19-Phag immunisiert. Wir verwendeten dazu ein immer am selben Tag hergestelltes sehr phagenreiches Lysat einer entsprechenden *Proteus*-Bouillonkultur, das durch Seitz-Filter bakterienfrei filtriert wurde. Während 40 Tagen injizierten wir davon 1 ccm intravenös dreimal wöchentlich. 10 Tage nach der letzten Injektion entnahmen wir Blut. Die Wirkung der Anti-Phagen-Seren prüften wir in folgenden Versuchen:

Wir gaben das Serum in einer Verdünnung 1:10 zu einem bakterienfrei filtrierten Lysat und liessen das Ganze während 2 Stunden bei 37 ° C stehen. Parallel dazu stellten wir für Kontrollversuche normales Kaninchenserum 1:10 mit demselben Lysat und das Lysat ohne Serum in den Brutschrank. Zur Prüfung der Phagenwirkung stellten wir nach 2 Stunden Verdünnungsreihen her und beimpften damit eine 3stündige Kultur von OX19 resp. OX2. Es ergaben sich folgende Titer:

	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹
Phag anti-OX2	L	L	L	L	L	L	L	L	o	o
Normalserum + Phag anti-OX2	L	L	L	L	L	L	L	L	o	o
Serum anti-Phag OX2 + Ph. OX2	L	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Serum anti-Phag OX19 + Ph. OX2	L	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Phag anti-OX19	L	L	L	L	L	L	L	L	L	o
Normalserum + Phag anti-OX19	L	L	L	L	L	L	L	L	L	o
Serum anti-Phag OX19 + Ph. OX19	L	L	o	o	o	o	o	o	o	o
Serum anti-Phag OX2 + Ph. OX19	L	L	o	o	o	o	o	o	o	o

L bedeutet vollständige Lyse, o bedeutet keine Lyse der entsprechenden Bakterienkultur in Bouillon nach dreistündigem Bebrüten bei 37 ° C.

Unsere Versuche ergaben somit für beide Anti-Phagenseren eine Hemmung des Phagen, der dadurch 10⁷ mal weniger aktiv war. Jedes Serum war gegenüber beiden Phagen gleich aktiv.

Die Aktivität der Anti-Phagenseren liess sich nur im Phagen-

Hemmungsversuch nachweisen. Obwohl wir mehrfach phagenhaltiges Lysat mit einem Titer von 10^{12} mit Anti-Phagenserum unterschichteten, trat nie eine sichtbare Praecipitation auf. Es gelang uns also nie, weder serologische Unterschiede zwischen den beiden Phagen noch solche ihrer Wirksamkeit gegenüber OX19 und OX2 zu finden, so dass wir anti-OX2-Phag und anti-OX19-Phag als identisch betrachten müssen.

3. Arbeitsmethode.

Die beiden *Proteus*stämme wurden durch tägliche Passagen auf Schrägagar bei 37° C gezüchtet. Um einen Uebergang von der O- zur H-Form zu verhindern, trockneten wir den Agar vor dem Impfen während 2—3 Tagen im Brutschrank. Einmal wöchentlich prüften wir die auf Agarplatten gezüchteten Stämme auf ihre Reinheit und entnahmen dabei Einzelkolonien für die nächstfolgende Passage.

Die Bacteriophagen züchteten wir täglich auf folgende Weise: Wir beimpften 30 ccm Bouillon mit einer Nadelspitze einer Agar-Kultur von *Proteus* und stellten die Kultur während drei Stunden in den Brutschrank. Nach dieser Zeit war die Bouillon leicht aber deutlich getrübt. Sie wurde nun zu gleichen Teilen in zwei kleine Erlenmeier-Kölbchen gegeben. Eines davon diente als Kontrolle, während wir in das andere einen Tropfen phagenhaltiges Lysat gaben. In einem dritten Bouillonröhrchen wurde der Phag auf Sterilität geprüft. Das Ganze wurde in den Brutschrank zurückgestellt bis zur vollständigen Aufhellung der *Proteus*kultur. Diese erfolgte im Durchschnitt nach 30—60 Minuten. Die *Proteus*-Kontrollkultur trübte sich zunehmend, während die nur mit Phag beimpfte Bouillon 24 Std. lang kontrolliert wurde und kein Wachstum zeigte.

Da erfahrungsgemäss der Phagengehalt im Moment der vollständigen Lyse am grössten ist, filtrierten wir das Lysat durch Seitz-Filter, sobald die entsprechende Kultur wieder klar war wie unbeimpfte Bouillon. Das so erhaltene Filtrat wurde im Kühlschrank bei $+4^{\circ}$ C aufbewahrt.

Zweimal monatlich wurde die Aktivität des Phagen ausgetitriert.

Verdünnungen bis 10^{-5} lysierten in der Regel in 40—80 Minuten. Bei 15stündiger Bebrütung beobachteten wir Titer bis 10^{12} , wobei allerdings die Aufhellung nie vollständig war, wegen des unterdessen aufgetretenen Sekundärwachstums. Wurde eine Bouillonkultur nach vollständiger Aufhellung weiter im Brutschrank gelassen, begann sie sich bereits nach ca. 2 Stunden erneut zu trüben. Auf nochmalige massive Phagenbeigabe bis 1:1 erfolgte keine Lyse mehr.

Zur Untersuchung der das Sekundärwachstum bedingenden Bakterien stellten wir die mit Phag beimpfte Proteus-Bouillonkultur nach beobachteter vollständiger Lyse für weitere 12 Stunden in den Brutschrank. Nach dieser Zeit war die Bouillon stark getrübt. Durch Verdünnungsreihen auf Agarplatten isolierten wir daraus unsere sekundären Stämme. Neben dieser Arbeitsmethode in flüssigem Nährboden wurde mehrere Male ein Bakterien-Phagengemisch auf Agarplatten ausgestrichen zur Beurteilung der sich darauf entwickelnden «Taches vierges» und zur Auszählung der auftretenden Sekundärkolonien. Auch hier verhielten sich beide Phagenstämme identisch in bezug auf Grösse und Form der auftretenden «Taches vierges». Bei diesen Versuchen isolierten wir ebenfalls mehrere das Sekundärwachstum bedingende Stämme. Alle so gewonnenen sekundären Stämme wurden in der Folge durch tägliche Passagen auf getrocknetem Schrägagar bei 37°C weitergezüchtet. Auf Agarplatten prüften wir ihre Reinheit und verifizierten einmal wöchentlich ihre Resistenz dem Bacteriophagen gegenüber.

Zudem untersuchten wir alle Sekundärstämme auf lysogene Eigenschaften, d. h. auf Phagenträgertum. Wir gingen dabei folgendermassen vor: 15 ccm Bouillon beimpften wir mit einer Nadelspitze des zu prüfenden sekundären Stammes und gleichzeitig mit derselben Menge unseres phagenfreien Proteus OX19 in der Annahme, ein allfälliger Phag des Sekundärstammes vermehre sich in der Mischkultur durch Lyse des phagensensiblen Proteus OX19. Nach 5stündigem Wachstum bei 37°C filtrierten wir durch bakteriendichtes Seitz-Filter und untersuchten nachher das Filtrat auf seinen Phagengehalt, indem wir 1 ccm zu 9 ccm einer 3stündigen Proteus OX19-Bouillonkultur beigaben.

Bei vorhandenen Bacteriophagen hätte Lyse auftreten müssen. Es wurden keine lysogenen Stämme gefunden.

Sowohl von *Proteus* OX2 als auch von OX19 erhielten wir zahlreiche phagenresistente Sekundärstämme, die als Mutanten aufzufassen sind. Sie wurden kulturell, fermentativ und serologisch untersucht.

Mutanten von *Proteus* OX2

Den von uns benützten phagensensiblen Zürcher Stamm *Proteus* OX2 entnahmen wir der Stamm-Sammlung des Zürcher Hygiene-Institutes. Daneben befand sich im serologischen Laboratorium desselben Institutes seit Jahren ein *Proteus* OX2, der ursprünglich vom ersten Stamm abgeimpft und getrennt gehalten worden war. Dieser zweite Stamm von *Proteus* OX2 wurde zur Reaktion nach Weil-Felix benützt und zu diesem Zwecke einmal wöchentlich frisch überimpft. Dabei wurden stets Einzelkolonien abgenommen. Schon zu Beginn unserer Arbeit stellten wir fest, dass sich der zweite OX2-Stamm unserem Bacteriophagen gegenüber refraktär verhielt. Selbst auf Zugabe eines hoch aktiven phagenhaltigen Filtrates im Verhältnis 1:1 erfolgte keine Lyse. Auch in Verdünnungen von 1:10 bis 1:10¹⁰ zeigte der Phag keine Wirkung. Wir prüften den Stamm fünfmal auf Phagenträgertum; er erwies sich jedoch nie als lysogen.

Die Annahme lag nahe, dass es sich auch hier um eine Mutante von *Proteus* OX2 handeln musste. Wahrscheinlich war beim Abimpfen einer Einzelkolonie durch Zufall einmal eine Mutante erfasst worden.

Zur Abklärung dieser Annahme untersuchten wir diesen Stamm zusammen mit den von uns isolierten phagenresistenten Stämmen. Unsere Arbeit erfasste insgesamt 60 aus *Proteus* OX2 entstandene Sekundärstämme: 40 davon wurden aus dem in Bouillon aufgetretenen Sekundärwachstum gewonnen, 15 wurden von Sekundärkolonien in «Taches vierges» entnommen und einer war der im serologischen Laboratorium vorgefundene phagenresistente *Proteus* OX2. Vier weitere Sekundärstämme wurden aus Seitz-filtrierter phagenhaltiger Bouillon isoliert, die bei Zimmertemperatur in Reagensröhrchen 3 Wochen lang standen und sich sekundär getrübt hatte. Ob dabei einzelne

Bakterien das Filter passiert hatten oder ob es sich um eine Kontamination des Filtrates nach der Filtration handelte, konnte nachträglich nicht entschieden werden.

Wir numerierten unsere sekundären Stämme von Proteus OX2 mit M 1—M 60. Die aus dem serologischen Laboratorium stammende Mutante war Proteus OX2 M 1. Wir verfolgten sie während 70 Agarpassagen. Proteus OX2 M 2 wurde 150 Mal und alle übrigen sekundären Stämme 20 Mal überimpft. Dabei blieben die Resistenz dem Phagen gegenüber sowie die kulturellen, fermentativen und serologischen Eigenschaften aller Stämme konstant. Die Sekundärstämme wurden mehrere Male auf Reinheit geprüft, indem Einzelkolonien von Agarplatten fermentativ und serologisch sowie auf ihre Phagenresistenz untersucht wurden.

Zuerst testeten wir alle 60 Sekundärstämme mit unserem Anti-Proteus OX2-Kaninchenserum (das durch Immunisierung mit dem phagensensiblen Proteus OX2 gewonnen worden war). Wir machten die Erfahrung, dass anscheinend reine O-Stämme, die auf Agarplatten typische O-Kolonien ergaben und im hängenden Tropfen vollständig unbeweglich waren, doch eine gemischte H- und O-Agglutination zeigten. Um eine reine Agglutination vom Typ O zu erhalten, erhitzten wir jeweilen die Bakterienaufschwemmung während 1 Stunde auf 100° C. Es genügen offenbar für das Auftreten der gemischten H-O-Agglutination sehr kleine Mengen von H-Antigen, das auch in typischen O-Stämmen vorhanden sein kann.

Die Agglutinationsröhrchen standen während 2 Stunden bei 37° C und anschliessend bei 4° C. Die endgültige Ablesung der Resultate erfolgte nach 20 Stunden. Auf diese Weise erhielten wir körnige Agglutination, die O-Stämmen entspricht.

Unser Anti-Proteus OX2-Kaninchenserum ergab mit den 60 Sekundärstämmen von Proteus OX2 folgende Resultate:

Serumverdünnung:	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Kontrolle
+ Proteus OX2	+	+	+	+	+	+	—	
+ Proteus OX2 M 1—M 57 .	+	+	+	+	+	+	—	—
+ Proteus OX2 M 58 . .	—	—	—	—	—	—	—	—
+ Proteus OX2 M 59 . .	—	—	—	—	—	—	—	—
+ Proteus OX2 M 60 . .	—	—	—	—	—	—	—	—

57 Sekundärstämme wurden also bis zum gleichen Titer agglutiniert wie der zur Immunisierung verwendete phagensensible *Proteus* OX2. 3 Sekundärstämme ergaben jedoch auch bei einer Serumverdünnung 1:10 keine Agglutination, d. h. sie besitzen ein von *Proteus* OX2 verschiedenes O-Antigen.

Zur serologischen Untersuchung von M 58, 59 und 60 immunisierten wir mit jedem dieser drei Stämme ein Kaninchen. Die entsprechenden Seren ergaben folgende Agglutinationen:

<i>Serum anti-M 58</i>		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	Kontr.
+	<i>Proteus</i> OX2 M 58 .	+	+	+	+	+	—	—
+	» » M 59 .	+	+	+	+	+	—	—
+	» » M 60 .	—	—	—	—	—	—	—
+	» » M 1 .	—	—	—	—	—	—	—
<i>Serum anti-M 59</i>		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	Kontr.
+	<i>Proteus</i> OX2 M 58 .	+	+	+	±	—	—	—
+	» » M 59 .	+	+	+	±	—	—	—
+	» » M 60 .	—	—	—	—	—	—	—
+	» » M 1 .	—	—	—	—	—	—	—
<i>Serum anti-M 60</i>		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	Kontr.
+	<i>Proteus</i> OX2 M 58 .	—	—	—	—	—	—	—
+	» » M 59 .	—	—	—	—	—	—	—
+	» » M 60 .	+	+	+	+	+	+	—
+	» » M 1 .	—	—	—	—	—	—	—

Bei kreuzweiser Absorption der Seren anti-M 58 und anti-M 59 werden alle Agglutinine entfernt. M 58 und M 59 besitzen also dasselbe O-Antigen, das von demjenigen von M 60 verschieden ist. Von den 60 Sekundärstämmen bilden M 1—M 57 eine, M 58 und M 59 eine zweite und M 60 eine dritte Mutante, so dass wir also drei Mutationsformen isolierten.

Bei allen 60 Sekundärstämmen waren sich die Bakterien in Grösse und Form vollständig gleich und waren unbeweglich. Auf festem Agar gaben alle Stämme wie typische O-Formen runde, seitlich scharf begrenzte Kolonien mit glatter Oberfläche. Die Kolonien eines einzigen Sekundärstammes unterschieden sich in bezug auf ihre Farbe: *Proteus* OX2 sowie die Sekundärstämme M 1—M 59 ergaben ziemlich transparente, weiss-gelbliche Kolonien, während M 60 eine ausgeprägtere gelbe Pigmentbildung

zeigte. Die Kolonien von M 60 waren auch etwas grösser. Die Kulturen aller 60 Sekundärstämme wiesen den für *Proteus* typischen Geruch auf.

Es gelang uns nie, einen der Sekundärstämme in die H-Form überzuführen, obwohl wir auf feuchten Agar impften und die Kulturen 10 Tage lang bei Zimmertemperatur stehen liessen. Trotzdem trat häufig mit dem anti-*Proteus* OX2-Serum eine gemischte H-O-Agglutination auf, wenn die Bakterienaufschwemmung nicht erhitzt worden war. Alle Sekundärstämme wurden in der Folge auf ihre fermentativen Leistungen geprüft. Für die Vergärung der Kohlenhydrate benutzten wir Hottinger-Bouillon mit entsprechender einprozentiger Lösung. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

	NH ₃ -Bildung	H ₂ S-Bildung	Indol-Bildung
	+ in 24 Std.	+ in 24 Std.	+ in 24 Std.
Prot. OX2			
Prot. OX2 M 1—57	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 58	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 59	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 60	id.	id.	id.

	Gelatineverflüssigung	Glucose	Galactose
	— nach 7 Tg.	Säure + Gas in 24 Std.	S. in 24 Std
Prot. OX2			
Prot. OX2 M 1—57	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 58	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 59	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 60	id.	id.	id.

	Maltose	Xylose	Salicin	Saccharose
	S. in 24 Std.	S. in 24 Std.	S. in 24 Std.	S. in 24 Std.
Prot. OX2				
Prot. OX2 M 1—57	id.	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 58	id.	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 59	id.	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 60	id.	id.	id.	— nach 7 Tg.

	Inulin	Laevulose	Trehalose
	S. in 48 Std.	± S. nach 7 Tg.	± S. nach 7 Tg.
Prot. OX2			
Prot. OX2 M 1—57	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 58	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 59	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 60	id.	id.	id.

	Zulkowski-Stärke	Lactose	Mannit
Prot. OX2	± S. nach 7 Tg.	— nach 7 Tg.	— nach 7 Tg.
Prot. OX2 M 1—57	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 58	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 59	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 60	id.	id.	S. in 24 Std.

	Sorbit	Inosit	Dulcit
Prot. OX2	— nach 7 Tg.	— nach 7 Tg.	— nach 7 Tg.
Prot. OX2 M 1—57	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 58	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 59	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 60	id.	id.	id.

	Raffinose	Arabinose	Rhamnose
Prot. OX2	— nach 7 Tg.	— nach 7 Tg.	— nach 7 Tg.
Prot. OX2 M 1—57	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 58	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 59	id.	id.	id.
Prot. OX2 M 60	id.	id.	id.

In fermentativer Hinsicht unterschied sich ein einziger Sekundärstamm von den übrigen Stämmen, indem er Saccharose nicht angriff, Mannit aber unter Säurebildung vergärte. M 1 bis M 59 verhielten sich genau gleich wie der phagensensible *Proteus* OX2.

Um zu sehen, ob die Stämme M 1 bis M 57, die vom Anti-*Proteus* OX2-Kaninchenserum agglutiniert werden, dennoch serologisch von *Proteus* OX2 verschieden seien, immunisierten wir je ein Kaninchen mit einer Bakterienaufschwemmung von M 1 und M 2. Wir gingen dabei in der gleichen Weise vor wie zur Gewinnung des Anti-*Proteus* OX2-Serums. Die so gewonnenen Anti-M 1- und Anti-M 2-Seren agglutinierten unsere Sekundärstämme folgendermassen, wobei wir auch hier während einer Stunde auf 100° C erhitzte Bakterien verwendeten, um ausschliesslich Agglutinationen vom O-Typ zu erhalten:

<i>Serum anti-M 1</i>	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	Kontrolle
+ Prot. OX2	+	+	+	+	+	+	—	—	—
+ M 1—M 57	—	—	—	+	—	+	—	—	—
+ M 58—M 60	—	—	—	—	—	—	—	—	—

<i>Serum anti-M 2</i>	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	Kontrolle
+ Prot. OX2	+	+	+	+	+	+	+	—	—
+ M 1—M 57	+	+	+	+	+	+	+	—	—
+ M 58—M 60	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Auch hier wurden der phagensensible *Proteus* OX2 und seine Sekundärstämme M 1—M 57 bis zur gleichen Verdünnung agglutiniert, während sich M 58, M 59 und M 60 verschieden verhielten.

Mit Hilfe der gekreuzten Absättigung untersuchten wir daraufhin unsere Kaninchenseren auf stammesspezifische Antikörper. Wir verdünnten die Seren zu diesem Zwecke 1:10 und gaben im Ueberschuss lebende Bakterien zu, die wir einer 24-stündigen Agarkultur entnahmen. Das Ganze stellten wir für zwei Stunden in den Brutschrank mit 37° C und liessen nachher bei 4° C stehen. Nach 24 Stunden prüften wir auf vollständige Absättigung und restliche Antikörper:

<i>Serum anti-Proteus</i> OX2 absorbiert mit M 1	1:10	1:20	1:40	Kontrolle
+ M 1	—	—	—	—
+ <i>Proteus</i> OX2	—	—	—	—
<i>Serum anti-Proteus</i> OX2 absorbiert mit M 2				
+ M 2	—	—	—	—
+ <i>Proteus</i> OX2	—	—	—	—
<i>Serum anti-Proteus</i> OX2 M 1 absorbiert mit OX2				
+ <i>Proteus</i> OX2	—	—	—	—
+ M 1	—	—	—	—
<i>Serum anti-Proteus</i> OX2 M 1 absorbiert mit M 2				
+ M 2	—	—	—	—
+ M 1	—	—	—	—
<i>Serum anti-Proteus</i> OX2 M 2 absorbiert mit OX2				
+ <i>Proteus</i> OX2	—	—	—	—
+ M 2	—	—	—	—
<i>Serum anti-Proteus</i> OX2 M 2 absorbiert mit M 1				
+ M 1	—	—	—	—
+ M 2	—	—	—	—

Demnach entfernte sowohl die Absorption mit dem homologen als mit dem heterologen Stamm die Agglutinine aus den entsprechenden Seren. *Proteus* OX2 und die Sekundärstämme M 1 bis M 57 besitzen dasselbe O-Antigen.

Wir untersuchten, ob nicht mit Hilfe der Praecipitation eine weitere serologische Aufspaltung möglich wäre. Eine Bouillonkultur von Proteus OX2, M 1 und M 2 liessen wir 10 Tage lang im Brutschrank bei 37 ° C, damit möglichst viele Bakterien der Autolyse verfallen. Dann filtrierten wir durch bakteriendichte Seitz-Filter. In Praecipitirröhrchen unterschichteten wir das Filtrat in entsprechenden Verdünnungen mit unsern spezifischen Seren und lasen nach 30 Minuten folgende Resultate ab:

Filtrat von Proteus OX2 verdünnt	1	1:10	1:100	1:1 000	1:10 000	1:100 000
+ Serum anti-Proteus OX2	+	+	+	+	÷	—
+ » » » OX2 M 1	+	+	+	+	÷	—
+ » » » OX2 M 2	+	+	+	+	+	—

Filtrat von Proteus OX2 M 1						
+ Serum anti-Proteus OX2	+	+	+	+	+	—
+ » » » OX2 M 1	+	+	+	+	÷	—
+ » » » OX2 M 2	+	+	+	+	+	—

Filtrat von Proteus OX2 M 2						
+ Serum anti-Proteus OX2	+	+	+	+	+	—
+ » » » OX2 M 1	+	+	+	+	+	—
+ » » » OX2 M 2	+	+	+	+	+	—

Unsere bakteriell mit heterologen Stämmen abgesättigten Seren ergaben keine Praecipitation mehr:

	Filtrat von Proteus OX2	unverdünnt	1:10 verd.
+ Serum anti-Proteus OX2	abs. mit M 1	—	—
+ » » » OX2	» » M 2	—	—
+ » » » OX2 M 1	» » OX2	—	—
+ » » » OX2 M 1	» » M 2	—	—
+ » » » OX2 M 2	» » OX2	—	—
+ » » » OX2 M 2	» » M 1	—	—

	Filtrat von Proteus OX2 M 1	unverdünnt	1:10 verd.
+ Serum anti-Proteus OX2	abs. mit M 1	—	—
+ » » » OX2	» » M 2	—	—
+ » » » OX2 M 1	» » OX2	—	—
+ » » » OX2 M 1	» » M 2	—	—
+ » » » OX2 M 2	» » OX2	—	—
+ » » » OX2 M 2	» » M 1	—	—

Filtrat von Proteus OX2 M 2					unverdünnt	1:10 verd.
+	Serum anti-Proteus	OX2	abs. mit	M 1	—	—
+	»	»	»	OX2	»	» M 2
+	»	»	»	OX2 M 1	»	» OX2
+	»	»	»	OX2 M 1	»	» M 2
+	»	»	»	OX2 M 2	»	» OX2
+	»	»	»	OX2 M 2	»	» M 1

Wir haben bereits erwähnt, dass auch typische O-Stämme Spuren von H-Antigen enthalten müssen; denn die damit immunisierten Kaninchen bildeten neben den O- auch H-Antikörper.

Zur Untersuchung dieser noch vorhandenen H-Quote töteten wir je eine Kultur von Proteus OX2 und Proteus OX2 M 2 mit 2% Formalin, das wir während 24 Std. bei 37° einwirken ließen. Mit dem so erhaltenen H-Antigen der Bakterien absorbieren wir kreuzweise die entsprechenden Seren, und stellten fest, dass dadurch in jedem Falle alle H-Agglutinine aus den Seren entfernt wurden:

Serum anti-Proteus «OX2» abs. mit M 2	1:10	1:20	1:40
+ Proteus HX2	—	—	—
+ Proteus HX2 M 2	—	—	—
Serum anti-Proteus «OX2 M 2» abs. mit HX2			
+ Proteus HX2	—	—	—
+ Proteus HX2 M 2	—	—	—

Zusammenfassend ergibt sich aus diesen Untersuchungen folgendes Bild: Die überwiegende Mehrzahl der Proteus-OX2-Sekundärstämme gehören einer einzigen Mutante an, und lassen sich weder kulturell, fermentativ noch serologisch vom originären Stamm unterscheiden. Ihr einziges Charakteristikum ist ihre Resistenz dem Bacteriophagen gegenüber, d. h. es gelingt mit Hilfe des Bacteriophagen, Proteus OX2 in zwei Untergruppen aufzuspalten, in eine phagensensible und phagenresistente. Daneben gibt es eine seltenere Proteus OX2-Mutante, die sich kulturell und fermentativ gleich verhält wie der originäre Stamm, aber ein von diesem verschiedenes O-Antigen besitzt. Wir isolierten eine einzige Mutante, die neben einem

vom originären Stamm OX2 wie von den übrigen Mutanten verschiedenen O-Antigen auch fermentative und kulturelle Unterschiede aufweist.

Proteus OX2 mutiert also nach verschiedenen Richtungen mit unterschiedlicher Häufigkeit der einzelnen Mutanten.

Mutanten von Proteus OX19

In analoger Weise wie bei Proteus OX2 untersuchten wir auch die Mutanten von Proteus OX19. Ueber die Ergebnisse haben wir bereits in einer kurzen Mitteilung zusammen mit Frl. R. Ben Gurion berichtet *. Für die Vollständigkeit dieser Arbeit ist es aber unerlässlich, unsere Untersuchungen hier nochmals detailliert aufzuführen.

Vom Zürcher Stamm Proteus OX19 wurden 50 sekundäre, phagenresistente Stämme isoliert. Davon wurden 37 aus dem sekundären Wachstum in Bouillon gewonnen, 10 stammen aus Sekundärkolonien in «Taches vierges» auf Agarplatten und 3 wurden aus Seitz-filtriertem phagenhaltigem Lysat isoliert, das 3 Wochen lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden war. Bei diesen drei letzten Stämmen stellt sich die gleiche Frage der sekundären Kontamination wie beim analogen Fall von Proteus OX2.

Die so isolierten Sekundärstämme von Proteus OX19 M 1 bis M 50 wurden kulturell, fermentativ und serologisch untersucht. Durch tägliches Ueberimpfen auf trockenen Agar wurden von M 1 170 Passagen und von M 2 — M 50 je 20 Passagen gemacht, wobei sie in allen ihren Eigenschaften konstant blieben. Einmal wöchentlich wurden alle Stämme auf Phagenresistenz und Reinheit geprüft. Alle Sekundärstämme erwiesen sich als nicht lysogen.

Die Kolonien auf Agar waren sich bei Proteus OX2, Proteus OX19 und Proteus OX19 M 1 — M 50 vollständig gleich. Insbesondere traten nie R-Formen auf. Eine besondere Pigmentbildung konnte bei keinem der Stämme beobachtet werden.

Die Sekundärstämme M 1 — M 50 wuchsen in Kolonien, die typischen O-Formen entsprachen, und auch 10tägige Kulturen

* EXPERIENTIA: V/11, 1949, p. 144.

auf feuchtem Agar bei Zimmertemperatur wiesen nie H-Formen auf. Die Resultate unserer Prüfung auf fermentative Leistungen ergeben sich aus folgendem Schema, wobei wir zum Vergleich auch die Leistungen von Proteus OX2 anführen:

	<i>NH₃-Bildung</i>	<i>H₂S-Bildung</i>	<i>Indol-Bildung</i>
Proteus OX2	+ in 24 Stunden	+ in 24 Stunden	+ in 24 Stunden
Proteus OX19	id.	id.	id.
Prot. OX19 M 1 — 50	id.	id.	id.

	<i>Gelatine-verflüssigung</i>	<i>Glucose</i>	<i>Galactose</i>
Proteus OX2	— nach 7 Tagen	Säure + Gas in 24 Stunden	S. in 24 Stunden
Proteus OX19	id.	id.	id.
Prot. OX19 M 1 — 50	id.	id.	id.

	<i>Maltose</i>	<i>Xylose</i>	<i>Salicin</i>
Proteus OX2	S. in 24 Stunden	S. in 24 Stunden	S. in 24 Stunden
Proteus OX19	id.	id.	id.
Prot. OX19 M 1 — 50	id.	id.	id.

	<i>Saccharose</i>	<i>Inulin</i>	<i>Laevulose</i>
Proteus OX2	S. in 48 Stunden	S. in 48 Stunden	± S. nach 7 Tg.
Proteus OX19	id.	id.	id.
Prot. OX19 M 1 — 50	id.	id.	id.

	<i>Trehalose</i>	<i>Zulkowski-Stärke</i>
Proteus OX2	± S. nach 7 Tg.	± S. nach 7 Tg.
Proteus OX19	id.	id.
Prot. OX19 M 1 — 50	id.	id.

	<i>Lactose</i>	<i>Mannit</i>	<i>Sorbit</i>
Proteus OX2	— nach 7 Tagen	— nach 7 Tagen	— nach 7 T agen
Proteus OX19	id.	id.	id.
Prot. OX19 M 1 — 50	id.	id.	id.

	<i>Inosit</i>	<i>Dulcit</i>	<i>Raffinose</i>
Proteus OX2	— nach 7 Tagen	— nach 7 Tagen	— nach 7 T agen
Proteus OX19	id.	id.	id.
Prot. OX19 M 1 — 50	id.	id.	id.

	<i>Arabinose</i>	<i>Rhamnose</i>
Proteus OX2	— nach 7 Tagen	— nach 7 Tagen
Proteus OX19	id.	id.
Prot. OX19 M 1 — 50	id.	id.

Einerseits verhalten sich also *Proteus* OX2 und OX19 völlig gleich, und anderseits ergab sich fermentativ kein Unterschied zwischen *Proteus* OX19 und den von uns gewonnenen Sekundärstämmen. Zur serologischen Prüfung verwendeten wir das mit dem originären Stamm hergestellte anti-*Proteus* OX19-Kaninchenserum. Zur Agglutinationsprobe entnahmen wir die Bakterien wieder einer 18stündigen Agarkultur und töteten sie durch 1stündiges Erhitzen auf 100 ° C. Mit dieser Bakterienaufschwemmung erhielten wir Agglutinationen vom O-Typ. Auch hier kontrollierten wir nach 2 Stunden bei 37 ° C auf allfällig doch auftretende H-Agglutination und lasen die endgültigen Resultate nach 24 Stunden (4 °) ab.

Serum anti-Prot. OX19	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	Kontr.
+ Bakt. <i>Proteus</i> OX19	+	+	+	+	+	+	+	—	—
+ Bakt. <i>Proteus</i>									
OX19 M 1—50	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Alle Sekundärstämmen besitzen demnach das O-Antigen des originären Stammes nicht mehr.

Auch das anti-*Proteus* OX2-Kaninchenserum agglutinierte keinen dieser sekundären OX19-Stämme. Es stellte sich nun die Frage, ob nicht OX19-Mutanten OXK-Stämme sein könnten. Dieser Annahme widersprachen allerdings schon unsere fermentativen Untersuchungen; denn OXK-Stämme bilden kein Indol und vergären Maltose nie. Trotzdem führten wir die entsprechenden serologischen Untersuchungen durch. Nach der früher beschriebenen Technik immunisierten wir ein Kaninchen während 30 Tagen mit abgetöteten Bakterien von *Proteus* OXK. Das so gewonnene Immunserum ergab folgende Agglutinationen vom O-Typ:

Serum anti-Prot. OXK	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	Kontr.
+ Bakt. <i>Proteus</i> OXK	+	—	+	+	+	+	+	—	—
+ Bakt. <i>Proteus</i>									
OX19 M 1—50	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Es handelt sich also bei keinem Sekundärstamm um einen *Proteus* OXK-Stamm. Das anti-OXK-Serum agglutinierte übrigens auch keine der OX2-Mutanten.

Zum Nachweis des O-Antigens der OX19-Mutanten immunisierten wir zwei Kaninchen während 35 Tagen mit einer abge-

töteten Bakterienaufschwemmung von *Proteus* OX19 M 1. Obwohl wir aus Sicherheitsgründen zwei Kaninchen wählten und genau gleich vorgingen wie bei unsern frühern Immunisierungen, erreichte unser Serum nur einen Titer von 1:160, was wohl den Schluss zulässt, dass die Mutante ein schwächeres O-Antigen besitzt als der originäre Stamm. Das anti-Mutanten-Serum agglutinierte sämtliche Sekundärstämme, nicht aber den Ausgangsstamm *Proteus* OX19:

Serum anti- <i>Proteus</i> OX19 M 1	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	Kontr.
+ Bakt. Prot. OX19 M 1—50	+	+	+	+	+	—	—
+ Bakt. Prot. OX19	—	—	—	—	—	—	—

Analog unsern Untersuchungen bei *Proteus* OX2 absorbierten wir auch dieses anti-Mutanten-Serum mit *Proteus* OX19 M 2 bis M 50. Dabei wurden alle Agglutinine aus dem Serum entfernt:

Serum anti-Prot. OX19 M 1						
absorbiert mit M 2—M 50	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	Kontrolle
+ Bakt. Prot. OX19 M 1	—	—	—	—	—	—
+ Bakt. Prot. OX19 M 2—50	—	—	—	—	—	—

Natürlich war es auch hier aus äussern Gründen nicht möglich, mit jedem der 50 isolierten Sekundärstämme ein Immunsorum herzustellen. Trotzdem darf aus unsern Untersuchungen geschlossen werden, dass unsere sekundären Stämme M 1—M 50 unter sich identisch sind, d. h. bei *Proteus* OX19 ist es immer dieselbe Mutante, die das Sekundärwachstum bedingt. Sie unterscheidet sich vom originären Stamm lediglich durch ein von diesem verschiedenes O-Antigen.

Obwohl es sich bei der Mutante um typische O-Stämme handelt, trat regelmässig eine gemischte HO-Agglutination auf, wenn die Bakterienaufschwemmung nicht mindestens 1 Stunde lang auf 100° C erhitzt wurde. Trotzdem sich diese Arbeit nicht mit H-Stämmen befasst, gingen wir der Frage nach, ob die Spuren von H-Antigen bei *Proteus* OX19 und bei der Mutante identisch seien. In analoger Weise wie bei *Proteus* OX2 töteten wir Kulturen von *Proteus* OX19 und seiner Mutante mit Formalin ab zur Erhaltung des H-Antigens. Diese Bakterienaufschwemmungen wurden durch unsere Immunseren während

2 Stunden im Brutschrank bei 37 ° C mit folgenden Titer agglutiniert:

Serum anti-Prot. «OX19»	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	Kontr.
+ Bakt. Prot. HX19	+	+	+	+	+	—	—
+ Bakt. Prot. HX19 M 1—50	+	+	+	+	+	—	—
Serum anti-Prot. «OX19 M 1»							
+ Bakt. Prot. HX19 M 1—50	+	+	+	+	—	—	—
+ Bakt. Prot. HX19	+	+	+	+	—	—	—

Durch kreuzweise Absättigung wurden alle H-Antikörper aus den Seren entfernt:

Serum anti-Prot. «OX19» abs. mit Prot. HX19 M 1	1:10	1:20	1:40	Kontr.
+ Bakt. Proteus HX19	—	—	—	—
+ Bakt. Proteus HX19 M 1—50	—	—	—	—

Serum anti-Prot. «OX19 M 1» abs. mit Prot. HX19

+ Bakt. Proteus HX19	—	—	—	—
+ Bakt. Proteus HX19 M 1—50	—	—	—	—

Es liessen sich demnach keine qualitativen Differenzen im Gehalt an H-Antigenen nachweisen.

Weil-Felix-Reaktion

Durch Vermittlung von Dr. Topolnik erhielten wir von Dr. Aleraj am Higijenski Zavod in Zagreb Serum eines Fleckfieberpatienten, das mit Proteus OX19 eine positive Weil-Felix-Reaktion ergab, nicht aber mit der Mutante:

Fleckfieberserum	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	Kontr.
+ Proteus OX19	+	+	+	+	+	+	+	—	—
+ Proteus OX19 M	—	—	—	—	—	—	—	—	—
+ Proteus OX2	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Ein von Prof. Olitzki aus Jerusalem erhaltenes Fleckfieberserum ergab dasselbe Resultat mit weniger hohem Titer:

Fleckfieberserum	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Kontr.
+ Proteus OX19	+	+	+	+	—	—	—
+ Proteus OX19 M	—	—	—	—	—	—	—
+ Proteus OX2	—	—	—	—	—	—	—

Dr. Lackman vom Rocky-Mountain Laboratory des U. S. Public Health Service in Hamilton (Mont.) sandte uns Serum eines

Patienten mit Rocky-Mountain spotted fever. Dieses Serum agglutinierte *Proteus* OX2 bis zum Titer 1:320 und *Proteus* OX19 1:160. Damit prüften wir unsere OX2-Stämme:

Rocky-Mountain spotted fever-Serum	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Kontr.
+ <i>Proteus</i> OX2	+	+	+	+	+	—	—
+ <i>Proteus</i> OX2 M 1—M 57	+	+	+	+	+	—	—
+ <i>Proteus</i> OX2 M 58—M 60	—	—	—	—	—	—	—

Serum eines Kaninchens, das mit murinem Fleckfieber infiziert worden war, ergab ebenfalls eine positive Weil-Felix-Reaktion und bestätigte unsere Resultate:

Serum eines Kan. mit Mur. Fleckfieber	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Kontr.
+ <i>Proteus</i> OX2	+	+	+	+	—	—	—
+ <i>Proteus</i> OX2 M 1—M 57	+	+	+	+	—	—	—
+ <i>Proteus</i> OX2 M 58—M 60	—	—	—	—	—	—	—
+ <i>Proteus</i> OX19	+	+	+	+	+	—	—
+ <i>Proteus</i> OX19 M 1—M 50	—	—	—	—	—	—	—

Keine der Mutanten, die ein vom originären Stamm verschiedenes O-Antigen aufwiesen, wurden von Fleckfieberserum, resp. Rocky-Mountain spotted fever-Serum agglutiniert. Hingegen verhält sich die OX2-Mutante, die das gleiche O-Antigen besitzt wie der Ausgangsstamm, auch bei der Weil-Felix-Reaktion wie der originäre Stamm.

Da bei allen Mutanten das Vorhandensein eines *Proteus* OXK ausgeschlossen war, erübrigte sich die schwierige Beschaffung von Serum eines Tsutsugamushi-Patienten, d. h. eines Serums, das nur mit *Proteus* OXK eine Weil-Felix-Reaktion ergibt.

Häufigkeit der Mutationen bei *Proteus* OX2 und OX19

Mit derselben Phagenverdünnung wurden auf Agarplatten, die mit gleichen Mengen *Proteus* OX2 resp. OX19 beimpft worden waren, «Taches vierges» produziert. Um die Häufigkeit der Mutanten ungefähr abschätzen zu können, zählten wir bei beiden Stämmen die Sekundärkolonien in 20 «Taches vierges» von je 5 mm Durchmesser:

<i>Proteus OX2</i>		<i>Proteus OX19</i>	
83 Kolonien		6 Kolonien	
60 »		2 »	
15 »		7 »	
94 »		6 »	
79 »		8 »	
90 »		3 »	
70 »		3 »	
70 »		2 »	
62 »		6 »	
70 »		2 »	
42 »		0 »	
39 »		4 »	
36 »		3 »	
18 »		4 »	
13 »		5 »	
16 »		7 »	
16 »		9 »	
80 »		12 »	
56 »		3 »	
51 »		5 »	
Durchschnitt: 58 Kolonien		Durchschnitt: 5 Kolonien	

Auch dieses Ergebnis weist auf die grössere Bereitschaft zur Bildung von Mutanten bei *Proteus OX2* hin, d. h. *Proteus OX2* bildet zahlreiche und unter sich verschiedene Mutanten, während bei *Proteus OX19* nur eine Mutante mit weit geringerer Häufigkeit vorkommt.

Angriffspunkt des Bacteriophagen

Da der Bacteriophag *OX2*- und *OX19*-Stämme gleichermaßen lysierte, lag die Annahme nahe, der Angriffspunkt der Phagenwirkung sei das X-Antigen. Dem widersprach allerdings die Tatsache, dass es phagenresistente *OX2*-Stämme gibt (*Proteus OX2 M 1 — M 57*), die das X-Antigen noch besitzen, d. h. von Fleckfieberserum noch agglutiniert werden. Zur Klärung dieser Frage führten wir folgenden Versuch durch:

Wenn der Bacteriophag am X-Antigen angreift, so muss Fleckfieberserum, das Antikörper gegen das X-Antigen enthält, durch Blockierung dieses X-Antigens die Phagenwirkung auf-

heben resp. vermindern. Wir versetzten eine zweistündige Proteus OX19-Bouillonkultur mit Fleckfieberserum in Verdünnung 1:200. Stärkere Konzentrationen des Fleckfieberserums bewirkten eine sofortige Agglutination der Bakterien, während diese bei der Verdünnung 1:200 erst nach 1½ bis 2 Stunden sichtbar wurde. An dieser mit Flecktyphusserum versetzten Bouillonkultur wurde die Aktivität des Bacteriophagen austitriert, wobei zur Kontrolle ein Parallelversuch mit Normalserum gemacht wurde.

Phagenverdünnung	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	Kontr.
+ Prot. OX19 mit Fleckfieberserum	L	L	o	o	o	o	o	o
+ Prot. OX19 mit Normalserum .	L	L	L	L	L	o	o	o

L = Lyse, o = keine Lyse

Die Ablesung erfolgte nach 1½ Stunden. Normalserum und Fleckfieberserum ergeben einen Titerunterschied von 1000 mal, d. h. wenn wir zur Proteuskultur Fleckfieberserum geben, ist der Phag 1000 mal weniger aktiv. Wenn dies nun auf einer spezifischen Blockierung des X-Antigens beruht, so darf ein anti-Proteus HX19-Serum, das nur H-Antikörper besitzt, diesen Titerunterschied nicht geben.

Um ein reines anti-Proteus HX19-Serum zu gewinnen, sättigten wir bei unserem anti-Proteus X19-Kaninchenserum alle O-Antikörper ab mit Bakterien, die wir während 1 Stunde auf 100 ° C erhitzt und anschliessend mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen hatten. Nach 24 Stunden prüften wir auf vollständige Absorption:

Serum anti-Proteus HX19 absorbiert mit OX19	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	Kontr.
+ Proteus OX19 (1 Std. 100 °)	—	—	—	—	—	—	—
+ Proteus HX19 (lebend)	+	+	+	+	+	—	—

Die Ablesung der H-Agglutination erfolgte nach 2 Stunden, die der O-Agglutination nach 24 Stunden. Dieses reine anti-H-Serum gaben wir in einer Verdünnung 1:100 zur zweistündigen Proteus-Bouillonkultur, d. h. in einer Verdünnung, bei der die Agglutination ebenfalls erst in 1½ bis 2 Stunden sichtbar wurde. Die Aktivität des Bacteriophagen auf die mit anti-H-Serum versetzten Bakterien ergibt folgendes Schema:

Phagenverdünnung	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	Kontr.
+ Proteus HX19 mit anti-H-Serum .	L	L	o	o	o	o	o
+ Proteus HX19 mit Fleckfieberserum	L	L	o	o	o	o	o

Das Resultat wurde auch hier nach 11½ Stunden abgelesen. Das anti-H-Serum verzögert also die Phagenwirkung im gleichen Masse wie das Fleckfieberserum. Der Unterschied dem Normalserum gegenüber scheint einfach darauf zu beruhen, dass eine subvisible Agglutination der Bakterien die Aktivität des Phagen hemmt. Auf jeden Fall ist damit dargelegt, dass der Angriffspunkt für den Bacteriophagen nicht das X-Antigen ist. Dass der Bacteriophag auch mit einem in Lösung befindlichen X-Antigen nicht reagiert, zeigten wir durch folgenden Versuch: Wir bebrüteten zehn Tage lang eine Bouillonkultur von Proteus OX19 und eine solche von Mesentericus bei 37° C, dann filtrierten wir durch Seitz-Filter. Das Mesentericus-Filtrat benutzten wir für den Kontrollversuch. Das Filtrat von Proteus OX19 ergab noch in der Verdünnung 1:80 eine deutliche Präzipitation mit unserem anti-Proteus OX19-Kaninchenserum, enthielt also reichlich gelöstes Antigen. Wir gaben nun zum Bacteriophagen 1:1 das Filtrat von Proteus OX19, resp. im Kontrollversuch dasjenige von Mesentericus, zu und stellten das Ganze für 2 Stunden in den Brutschrank. Anschliessend bestimmten wir die Aktivität des Phagen:

Verd. d. Phagen:	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	Kontr.
nach ½ Std.:												
1. Phag mit												
Prot.-Filtrat:	L	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
2. Phag mit												
Mesent.-Filtrat:	L	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
nach 3 Std.:												
1. Phag mit												
Prot.-Filtrat:	L	L	L	L	L	L	L	o	o	o	o	o
2. Phag mit												
Mesent.-Filtrat:	L	L	L	L	L	L	L	o	o	o	o	o
nach 4 Std.:												
1. Phag mit												
Prot.-Filtrat:	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	o	o
2. Phag mit												
Mesent.-Filtrat:	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	o	o
L = Lyse o = keine Lyse												

Auch das gelöste X-Antigen hemmt somit den Bacteriophagen nicht. Ein aus Fleckfiebrickettsien gewonnenes Antigen, das ja das X-Antigen auch enthält, ist ebenfalls nicht imstande, den Phag zu hemmen. Dies zeigt folgender Versuch: Ein zur Impfung gegen Fleckfieber im Handel befindliches Antigen wird in einer Verdünnung 1:10 zum Bacteriophagen gegeben und das Ganze für 1 Stunde bei 37 ° C belassen. Als Kontrollversuch wird physiologische NaCl-Lösung 1:10 dem Phagen beigegeben und ebenfalls eine Stunde lang in den Brutschrank gestellt. Dann wird die Aktivität des Phagen ausgetitriert:

Phag + Antigen in Verdünnung	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	Kontrolle
+ Proteus OX19 Lyse nach 2 Std.	L	L	L	L	L	o	o
Phag + NaCl als Kontrolle	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	Kontrolle
+ Proteus OX19 Lyse nach 2 Std.	L	L	L	L	L	o	o

Eine Hemmung des Phagen durch Antigen von Fleckfieberrickettsien findet demnach nicht statt.

Mehrfache Versuche zeigten im übrigen, dass die Aktivität des Phagen auf H- und O-Stämme absolut dieselbe ist. Ueber den genauen Wirkungsmechanismus und den Angriffspunkt des Phagen lässt sich aber aus unsern Versuchen nichts aussagen.

Zusammenfassung

Von *Proteus* OX2 und *Proteus* OX19 isolierten wir aus dem Sekundärwachstum lysierter Kulturen phagenresistente Stämme, die Mutanten darstellen.

Bei *Proteus* OX19 sind alle Mutanten identisch, besitzen ein vom originären Stamm verschiedenes O-Antigen, unterscheiden sich aber weder kulturell noch fermentativ vom originären *Proteus* OX19.

Proteus OX2 ergibt eine hauptsächliche Mutante, die sich kulturell, fermentativ und serologisch vom originären Stamm nicht unterscheiden lässt. Daneben wurden zwei Mutanten mit besonderem O-Antigen isoliert, von denen eine auch kulturell und fermentativ vom originären Stamm abweicht.

Die Mutanten von *Proteus* OX2 und OX19 mit vom Ausgangsstamm verschiedenem O-Antigen ergeben keine Weil-Felix-Reaktion mit Fleckfieberserum, resp. Rocky-Mountain spotted fever Serum.

Es gelang, *Proteus* OX2 in zwei bisher nicht beschriebene Gruppen zu unterteilen, die sich nur durch den Bacteriophagen unterscheiden lassen und von denen die phagenresistente eine Mutante der phagensensiblen darstellt.

Für die freundliche Ueberlassung von Immunseren danke ich den Herren Prof. Olitzki, Dr. Topolnik, Dr. Aleraj und Dr. Lackmann. Zu besonderem Dank bin ich Frl. R. Ben Gurion und Herrn A. Leemann verpflichtet für ihre technische Hilfe.

CURRICULUM VITAE

CIVIS ARGOVIENSIS ET FILIUS MERCATORIS CUI-
USDAM MAIOR VICO OTHMARSINGENSI NATUS SUM
A. D. V. NON. MART. ANNO MCMXXII.

SCHOLIS PUBLICIS FREQUENTATIS ET EXAMINE
MATURITATIS EXPLETO ANNO MCMXLII STUDIUM
MEDICINAE MIHI PROPOSUI.

DISCIPULUM ARTIS MEDICAE SEX ANNOS UNIVERSI-
TATES TURICENSIS ET PARISIENSIS ME ACCEPERUNT.
AESTATE ANNI MCMXLVIII DIPLOMA HELVETICUM
ADEPTUS AB ARMINIO MOOSERO VIRO DOCTISSIMO
BACTERIOLOGIAE PROFESSORE AD EIUS ARTIS DIS-
CIPLINIS IN LABORATORIO STUDENDUM RECEPTUS
SUM.

